ナノ DDS 製剤の分析評価技術—総括—

加藤くみ子

Overview of Analytical Techniques for Evaluation of Nano-DDS Formulations

Kumiko Sakai-Kato

*Division of Drugs, National Institute of Health Sciences; 3-25-26 Tanomachi,
Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan.*

(Received August 6, 2018)

Nanotechnology-based formulations have attracted much attention as delivery tools for a variety of payloads. These payloads include oligonucleotides, peptides, and low-molecular weight chemical entities. Guidelines and reflection papers for nanotechnology-based drug products have been published by the Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare. These documents include the concept of quality by design (QbD) approach, as described in the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines. The quality attributes that affect efficacy and safety of nanotechnology-based drug products should be identified to establish the entire picture of the drug products. Hence it is essential to develop analytical methods for characterizing these attributes. Furthermore, to evaluate the comparability of nano-drug delivery system (DDS) formulations before and after changes to their manufacturing process, it is desirable to characterize the key attributes using more than one analytical method for each. Standardization of these analytical methods is underway. This paper provides an overview of the concept and significance of the QbD approach for nano-DDS formulations, guidelines for the development of nano-DDS formulations, and standardization of analytical methods for nano-DDS formulations.

Key words—nano-drug delivery system formulation; quality by design; analytical technique; standardization

1. はじめに

ナノテクノロジーを応用した drug delivery system (DDS) 製剤 (以下, ナノ DDS 製剤と称する) には, ナノエマルジョン, ナノスフェア, リポソーム, 高分子に薬物を結合させた製剤があり, わが国でも複数の製剤が承認されている.¹⁾ 1988 年には, わが国発のナノエマルジョン製剤が承認され, 既に後発品も登場している. また, 含糖酸化鉄注射液であるナノスフェア製剤も国内で開発された製剤である.

ナノサイズのキャリアに有効成分を封じ込むことによる製剤学的機能には, 有効成分の安定性向上, バイオアベイラビリティの向上, 放出制御, 標的性機能の付与等がある. 特に, 近年では, オリゴ核酸である siRNA のように, 生体内での安定性向上

や細胞内への薬物送達を目的とした膜透過性向上の手段としてナノ DDS 製剤が注目されている.²⁾ 筆者は, その実用化促進のためにナノ DDS 製剤のレギュラトリーサイエンス研究に取り組んでいる. 本稿では, ライフサイクルを通じた品質確保に資する製剤開発アプローチについて紹介し, その概念を取り入れたナノ DDS 製剤関連のガイドラインの紹介, さらに, ライフサイクルを通じた品質システムの構築を支える品質特性分析法の標準化について述べ, 誌上シンポジウムの総括としたい.

2. ナノ DDS 製剤開発へのクオリティーバイデザイン (quality by design; QbD) アプローチの適用

医薬品開発においては, 適正な品質を有する製品を設計すること, 及び意図した機能を有する製品を一貫して供給できる製造工程を設計することが重要である. 製剤開発研究や製造経験を通して得られた情報や知識により科学的理解が深まり, これが製造工程管理や規格の確立に役立つ. さらに製剤開発から得られた情報を品質リスクマネジメントの基盤とすることが可能である.³⁾

国立医薬品食品衛生研究所薬品部 (〒210-9501 川崎市川崎区殿町 3-25-26)

e-mail: kumikato@nihs.go.jp

本総説は, 日本薬学会第 138 年会シンポジウム S59 で発表した内容を中心に記述したものである.

昨今、このようなライフサイクルを通じた品質確保のため科学的体系的アプローチ (QbD アプローチ) の取り組みが医薬品開発に求められており,³⁾ 機能性製剤の代表であるナノ DDS 製剤についてもこのような管理戦略を構築することが望まれる。しかし、一般的な医薬品とは異なり、製剤特性や製造工程が複雑であり、また製剤特性や製造工程が製品毎に大きく異なると考えられ、QbD アプローチの例示は限られていた。そこで、筆者らは、乳酸・グリコール酸共重合体ナノ粒子をモデルとして、QbD アプローチの実践を試みた。⁴⁾ 具体的には製品特性に係わる重要品質特性 (critical quality attributes; CQA) と重要プロセスパラメータ (critical process parameter; CPP) の相関を明らかにするために、特性要因図及び分散分析を用いた品質リスクマネジメント (quality risk management; QRM) を行った。処方スクリーニングを兼ねた比較的初期の検討における QbD アプローチの実例であるが、開発段階におけるナノ DDS 製剤においても QbD アプローチの応用が可能と考えられ、今後ナノ DDS 製剤開発への応用が広がることを期待したい。

3. ナノ DDS 製剤の開発のためのガイドライン作成

わが国では、ナノ DDS 製剤開発のための指針として、3 件のガイドラインあるいはリフレクションペーパーが厚生労働省より発出されている。⁵⁻⁷⁾ それぞれ、ブロック共重合体ミセル医薬品、リポソーム製剤、及び核酸 (siRNA) を搭載したナノ製剤を対象に、開発や評価の際の考慮点を文書化したものである。内包薬物の適用範囲は、低分子化学合成品のほか、核酸、又はペプチドやタンパク質である。「核酸 (siRNA) 搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」は主として siRNA に焦点を当て作成されたが、他の核酸を搭載する際にも参考となるであろう。

「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」には、「製剤全体として製剤設計及び品質特性に対する評価を行い、管理範囲を設定していく必要がある。また、リポソーム製剤は製剤学的に複雑であり、必ずしも最終製品の品質試験のみでは十分に品質を管理できない場合がある。よって、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (The International Council

for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH) Q8 (R2) 及び Q11 ガイドラインに概説されている QbD の考えに基づいた製剤開発を強く推奨する」と明記されている。⁶⁾ 具体的には、「重要品質特性及び関連する特性値を踏まえ、製剤品質の一貫性を保証するための管理戦略を策定した上で、必要な規格及び試験方法を決定する」。また、「リポソーム構成成分の選択・処方と各成分の機能については、目標製品品質プロファイル及び製剤特性 (例えば、放出性、標的指向性など) への影響と関連付けて記述する」。さらに、「製剤設計、品質特性 (物理的、化学的及び生物学的特性)、製造工程などの変動が製剤特性にどのように影響するのか、開発段階で行った検討を明らかにし、必要に応じて薬物動態、有効性及び安全性に及ぼす影響についても評価・検討する」ことが重要である。⁶⁾

米国食品医薬品庁 (U.S. Food and Drug Administration; FDA) からは、2018 年にリポソーム製剤に関するガイダンスの最終版が公表された。⁸⁾ 2002 年に公表されたドラフトガイダンスは、新薬開発を対象とした文章であったが、その後、リポソーム製剤の後発品が米国で承認され、今回最終化されたガイダンスには、Abbreviated New Drug Applications (ANDA) 申請を経た製剤、つまりリポソーム製剤の後発品開発に関する内容も包含されている。ANDA 申請の際は、FDA から示されている製品特異的な生物学的同等性ガイダンス⁹⁾に従い、そのような文書が存在しない場合は、当該ガイダンスに従うことが新たに記されている。

FDA のガイダンスでは、日本のリポソーム製剤の開発に関するガイドラインと同様に、ICH の品質リスクマネジメントの概念が取り入れられており、内容は多くないものの CQA に関する項も新たに入っている。また、2002 年公表のドラフトガイダンスと同様、脂質成分の製造には有効成分と同様の管理が求められているが、さらに、合成脂質の製造に関してより医薬品の承認申請のための国際共通化資料であるコモン・テクニカル・ドキュメントに沿った内容の記載が推奨されている。つまり、脂質の合成過程や精製に関する詳細な記述、出発物質、製造工程の管理、特に重要工程と中間体の適切な管理に関する記載が推奨されている。⁸⁾

Fig. 1. Importance of Analytical Method Development and the Standardization

4. ナノ DDS 製剤の品質特性解析

ナノ DDS 製剤の構成成分の選択・処方と各成分の機能を、目標製品品質プロファイル及び製剤特性（例えば、放出性、標的指向性など）への影響と関連付けるためには、製剤機能を発揮するための生体との相互作用に関するメカニズム研究（科学的文献を参考とすることもあるだろう）、そしてその製剤機能を叶えるための品質特性を明らかにしていくことが必要となる。そのためには、複雑な製剤の品質特性を評価するための分析法の確立と標準化が重要となる（Fig. 1）。

Table 1 には、ブロック共重合体ミセル医薬品及びリポソーム製剤の主な品質特性を示した。ブロック共重合体ミセル医薬品では、会合数や、臨界ミセル濃度が主な品質特性として挙げられる。これらは、薬物の放出性やミセルの安定性等に係わる。一方、リポソーム製剤では、脂質膜の熱力学的な特性評価が薬物放出や安定性等に係わる品質特性と言えるであろう。

粒度分布や形態・構造、ゼータ電位等は、ブロック共重合体ミセル医薬品及びリポソーム製剤に共通した品質特性である。また、不純物は、安全性に係わる主要な品質特性の 1 つであり、その評価には原薬及び製剤の不純物に関する ICH ガイドライン（ICH Q3A, Q3B, Q3C, Q3D, M7 ガイドライン）¹⁰⁻¹⁴⁾ を参考にする。2000 年前後に策定された

Table 1. Representative Quality Attributes

Block copolymer micelle	Liposome
Particle size distribution	
Morphology	
Surface charge (zeta potential)	
<i>In vitro</i> release characteristics of the active substance	
Loading efficiency of the active substances	
Impurities (including aggregation)	
Physical state of the encapsulated active substance	
Surface properties (e.g., targeting ligand)	
Concentration dependency of the nanostructure [In some cases, this may be expressed as critical micelle concentration (cmc), or critical association concentration (cac).]	Thermodynamic properties of the liposome membrane

ICH Q3A（原薬）¹⁰⁾ ICH Q3B（製剤）¹¹⁾ 及び、ICH Q3C（医薬品の残留溶媒）¹²⁾ に加え、昨今では、Q3D（医薬品の元素不純物）¹³⁾ が平成 29 年 4 月 1 日以降、M7 [医薬品中の DNA 反応性（変異原性）不純物]¹⁴⁾ の管理が平成 28 年 1 月 15 日以降に申請される新医薬品において適用されているため、留意が必要である。さらに、ナノ DDS 製剤では製造工程や保存時に生じ得るキャリア由来の不純物（凝集体も含む）に留意が必要である。

薬物の封入量に加え、*in vitro* での薬物放出特性もナノ DDS 製剤の主要な品質特性である。「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品の共同リフレクションペーパー」には、「ブロック共重合体ミセルの *in vivo* における安定性を予測するために、信頼性、識別力のあるバリデーションされた *in vitro* 評価試験を確立し、生理的／臨床的に適切な溶媒中でブロック共重合体ミセルからの有効成分の放出を測定すべきである」⁵⁾ との記載がある。個々の製剤に応じて放出特性は異なるため、具体的な測定条件を本文書の中で示していないが、当該リフレクションペーパーの中では、識別力のある *in vitro* 放出試験の設定の重要性が記されている（Table 2）。*In vivo* での放出特性（つまり、循環血中での放出特性、標的部位での放出特性）とともに、品質確保の観点から *in vitro* 放出試験が重要な試験となる。また、標的部位での放出特性に関

Table 2. The Points to Consider for the Development of *in Vitro* Release Test

Main points to be considered
1. Defining the release of the active substance or polymer-active substance conjugate from carriers when in the circulation
2. Defining the release of the active substance or polymer-active substance conjugate from carriers at the targeted site of action. The proposed media should reflect the physiological environment of the formulations when in use; For formulations that are designed to release the active substance in response to an environmental change (e.g., a pH change) in the target tissue or endosome, release profiles of the active substance from the carriers that reflects the physiological environment. For formulations that are designed to release the active substance in response to a temperature change or external stimulation, release profiles of the active substances from the carriers resulting from the response to the expected temperature change or external stimulation.
3. Defining the stability on storage

しては、pH や温度などの生理的環境又は外部刺激に応じた放出試験の設定について「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」に記されている。⁶⁾ *In vitro* 放出特性法の具体的な開発事例について本誌上シンポジウムの他の著者の総説を参照してほしい。

5. 品質特性評価法の標準化

ナノ DDS 製剤の実用化を推進するために、ナノ DDS 製剤に特徴的な品質特性を評価する試験法の標準化や技術指針の作成が筆者らが取り組むべき課題の 1 つである。

ナノ DDS 製剤の特性において特に重要であるのが、サイズや形態である。Table 3 は、これまでに報告されているサイズや形態の評価法を示した。光散乱を利用した粒子径解析法には、動的光散乱法、ナノトラッキング法、レーザー回折法がある。このうち、動的光散乱法については、本誌上シンポジウムの他の著者が詳細を記しているの、参照してほしい。ナノトラッキング法は動的光散乱法と同様に粒子にレーザー光を照射した際の拡散係数から粒子径を算出する方法であるが、粒子個々の粒子径の解析や、粒子数の計測が可能である。同様に、個々の粒子の画像を解析し、その形状や粒子径のばらつきを直接観察可能な手法が、画像解析法である、具体

Table 3. The Size Analysis of Nano-DDS Formulations

Principal use	Analytical methods	Measurement principle
Determination of particle size distribution	Dynamic light scattering	Fluctuation of scattered light
	Nano tracking analysis	
	Laser diffraction	
Acquisition of image	Atomic force microscopy	Scan of the sample surface using nano-sized tip
	Electron microscopy	Production of image of the object and magnification by electromagnetic fields
Separation and fractionation	Centrifugal sedimentation method	Separation by density
	Size exclusion chromatography	Separation by hydrodynamic volume
	Field flow fractionation	Depending on the type of field flow fractionation, separation is based on different physical properties such as diffusion coefficient and mass

的には原子間力顕微鏡や電子顕微鏡法が用いられる。さらに、サイズ毎に分離し、各分画の分離状況を確認するとともに、分取・精製が可能な分析法もある。このような手法には、遠心沈降法、サイズ排除クロマトグラフィー法、流動場分離法がある。

開発中あるいは承認取得後において、製造工程の改良、生産規模の拡大、製品の安定性向上等の理由より、製品の製造工程を変更することがある。開発時における製法変更の同等性／同質性評価時の留意点は、ブロック共重合体ミセル医薬品及びリポソーム製剤に関するガイドラインで言及されている。^{5,6)} 製造工程の変更時、開発者は、当該製品の安全性及び有効性に有害な影響を及ぼすような変化がないことを示すため、関連する品質特性を評価する。製造工程変更前後の同等性／同質性評価作業に用いる試験の項目・内容は、製造工程変更によって生じる可能性のある製剤の品質特性上の変化を最大限検出できるよう、同じ品質特性項目（例えば、サイズや形状などのそれぞれ）を評価する場合にも、それぞれ異なる原理に基づいた物理的・化学的解析方法を複数採用して、データを収集することが重要である。¹⁵⁾ したがって、上述した原理の異なる複数の分析評価法を開発者が適切に使用できるように、それらの標準化の整備が望まれる。

日本薬局方の一般試験法には、レーザー回折法が「3.06 レーザー回折・散乱法による粒子径測定法」のタイトルで収載されている。¹⁶⁾ 当該試験法は国際調和された手法である。一方、動的光散乱法は、参考情報「動的光散乱法による液体中の粒子径測定法」として掲載されており、¹⁷⁾ 測定法の国際調和が日米欧三薬局方調和検討会議 (Pharmacopeial Discussion Group; PDG) で進行中である。¹⁸⁾ さらに、サイズ排除クロマトグラフィー法は日本薬局方一般試験法の収載に向けて原案の議論が行われているところである。また、サイズ排除クロマトグラフィー法の分離に関連する用語の整備が、「クロマトグラフィー」の国際調和においても進められている。¹⁹⁾ ナノ DDS 製剤の画像解析が可能な手法の標準化はまだ国内で行われていないことから、筆者らは、原子間力顕微鏡の標準化研究を進めている。²⁰⁾

2016 年には FDA 主催のレギュラトリーサイエンス会議 (Global Summit on Regulatory Science; GRS16) が開催され、そのメインテーマに、医薬品・医療機器・食品などのヘルスケア製品について、ナノテクノロジーの利用とナノテクノロジー応用製品の標準化が取り上げられた。²¹⁾ 筆者も組織委員として参画し、今後の課題等を議論する機会を得た。各機関や規制当局から出されている標準物質や規格文書、ガイドライン文書に関する情報は、会議資料「Read-Ahead Material」として取りまとめられており、上述した厚生労働省の3件のガイドラインやリフレクションペーパーも掲載されている。²¹⁾

総括

昨今、ナノ DDS 製剤には、内包薬物の多様化により細胞内送達などのより高度な機能が求められており、キャリア成分の処方が複雑となることが予想される。一方で、ナノ DDS 製剤の細胞内取り込み機能には、サイズのほか、電荷、形状、キャリアの硬さなど 製剤の様々な品質特性が複雑に影響していることが知られている。このように製剤特性に影響を与える品質特性をより多角的に解析し、ナノ DDS 製剤の全体像を構築していくことが、ナノ DDS 製剤の品質管理戦略の策定や承認後も含めた品質リスクマネジメントにおいて重要である。そのため、本誌上シンポジウムで議論された品質特性解析手法の開発とその標準化が有用であることは言うまでもない。本誌上シンポジウムの総括として

本総説を閉じたい。

謝辞 本研究成果の一部は、AMED 創薬基盤推進研究事業、AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業の支援により得られた。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Nanotonal Institute of Health Sciences (NIHS). “NIHS nanomedicines regulatory science.”: http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html, cited 11 July, 2018.
- 2) Tatiparti K., Sau S., Kashaw S. K., Iyer A. K., *Nanomaterials* (Basel), **7**, 77 (2017).
- 3) Ministry of Health, Labour and Welfare, PFSB/ELD Notification No. 0628-1, June 28, 2010, ICH Pharmaceutical Development Q8 (R2).
- 4) Kozaki M., Kobayashi S., Goda Y., Okuda H., Sakai-Kato K., *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 218–228 (2017).
- 5) Ministry of Health, Labour and Welfare, PFSB/ELS Notification No. 011-1, January 10, 2014, Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products.
- 6) Ministry of Health, Labour and Welfare, PSEHB/ELD Notification No. 0328-19, March 28, 2016, Guideline for the Development of Liposome Drug Products.
- 7) Ministry of Health, Labour and Welfare, PSEHB/ELD Administrative Notice, March 28, 2016, Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products.
- 8) U.S. Food and Drug Administration, “Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. Guidance for Industry,” 2018.
- 9) U.S. Food and Drug Administration. “Product-Specific Guidances for Generic Drug Development.”: <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm075207.htm>, cited 11

- July, 2018.
- 10) Ministry of Health, Labour and Welfare, PMSB/ELD Notification No. 1216001, December 16, 2002, ICH Impurities in New drug Substances Q3A(R2).
 - 11) Ministry of Health, Labour and Welfare, PMSB/ELD Notification No. 0624001, June 24, 2003, ICH Impurities in New drug Products Q3B(R2).
 - 12) Ministry of Health, Labour and Welfare, PMSB/ELD Notification No. 307, March 30, 1998, ICH Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R3).
 - 13) Ministry of Health, Labour and Welfare, PFSB/ELD Notification No. 0930-4, September 30, 2015, ICH Guideline for Elemental Impurities Q3D.
 - 14) Ministry of Health, Labour and Welfare, PSEHB/ELD Notification No. 1110-3, November 10, 2015, ICH Assessment and Control of DNA reactive (Mutagenic) impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7.
 - 15) Ministry of Health, Labour and Welfare, PFSB/ELD Notification No. 0426001, April 26, 2005, ICH Note for Guidance on Comparability of Biotechnological / Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process Q5E.
 - 16) Ministry of Health, Labour and Welfare, "Supplement I to The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition," 2017.
 - 17) Ministry of Health, Labour and Welfare, "The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition," 2016.
 - 18) Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. "Pharmacopoeial Discussion Group Meeting.": <http://www.pmda.go.jp/files/000212581.pdf>, cited 11 July, 2018.
 - 19) *Japanese Pharmacopoeial Forum*, **26**, 358–389 (2017).
 - 20) Takechi-Haraya Y., Goda Y., Sakai-Kato K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **410**, 1525–1531 (2018).
 - 21) U.S. Food and Drug Administration. "Global Summit on Regulatory Science (GSR16).": <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OC/OfficeofScientificandMedicalPrograms/NCTR/WhatWeDo/ucm488022.htm>, cited 11 July, 2018.